

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problems Mailbox.**

Identification of bacterial antibiotic resistance in e.g. Streptococcus pneumoniae - comprises hybridising DNA with sensitive-specific and resistance-specific DNA probes

Patent Assignee: MAX PLANCK GES FOERDERUNG WISSENSCHAFTEN

Inventors: HAKENBECK R

Patent Family

Patent Number	Kind	Date	Application Number	Kind	Date	Week	Type
DE 19717346	A1	19981029	DE 1017346	A	19970424	199849	B
WO 9848041	A2	19981029	WO 98DE1134	A	19980422	199849	
DE 19717346	C2	19990520	DE 1017346	A	19970424	199924	
EP 977894	A1	20000209	EP 98931984	A	19980422	200012	
			WO 98DE1134	A	19980422		
JP 2001520520	W	20011030	JP 98544739	A	19980422	200202	
			WO 98DE1134	A	19980422		

Priority Applications (Number Kind Date): DE 1017346 A (19970424)

Patent Details

Patent	Kind	Language	Page	Main IPC	Filing Notes
DE 19717346	A1		10	C07H-021/04	
WO 9848041	A2	G		C12Q-000/00	
Designated States (National): CA JP US					
Designated States (Regional): AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LU MC NL PT SE					
DE 19717346	C2			C07H-021/00	
EP 977894	A1	G		C12Q-001/68	Based on patent WO 9848041
Designated States (Regional): AT BE CH DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI LU MC NL PT SE					
JP 2001520520	W		57	C12Q-001/68	Based on patent WO 9848041

Abstract:

DE 19717346 A

Identification of antibiotic resistance in bacteria comprises isolating bacterial DNA and hybridising it with at least one sensitive-specific DNA probe and at least one resistance-specific DNA probe. Also claimed are probes (I)-(XIII) for identifying penicillin-resistant Streptococcus pneumoniae strains and probes (XIV)-(XIX) for identifying penicillin-sensitive Streptococcus pneumoniae strains. AGT CAG CAA CGG GTA AG (I) AAC GAA CGA TGG ACG GT (II) CAT TTC CAG CCC CCT CCA (III) TGC AGA TGC CAC GAT TC (IV) CTG GTC AGC TTC CTG CG (V) TGG TTA TCT AGT CGG GTT AA (VI) CTG TAT CGA TGA GTC CG (VII) AAC AGT TCT GCT GAA GAA G (VIII) TAG GAG CAC GCC ATC AGT (IX) GAC GAA ATG CCT ATC TTG (X) CTC TCA ATT TGT AGC ACC T (XI) CTA TTC TAA CCG TCT GAC A (XII) ATC AAA TAC CTA TAT GGT CC (XIII) TGG AGA ATA CTT CAA TAG C (XIV) GTC TAC TTG AAC AAA AAA TG (XV) TTA GTT GGG ACG GAC CCT (XVI) GTA ACG GTT CAA CAG CCT (XVII) CTC CGA TCA ATA CGT CTC T (XVIII) GCT CCA GAT GAA ATG TTT GT (XIX)

ADVANTAGE - Streptococci can be screened rapidly and reliably for antibiotic resistance.

Dwg.0/3

Derwent World Patents Index
© 2002 Derwent Information Ltd. All rights reserved.

PCT

WELTOORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro



AB
M

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ :	A2	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 98/48041
C12Q		(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 29. Oktober 1998 (29.10.98)

(21) Internationales Aktenzeichen:	PCT/DE98/01134		(81) Bestimmungsstaaten: CA, JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).
(22) Internationales Anmeldedatum:	22. April 1998 (22.04.98)		
(30) Prioritätsdaten:	197 17 346.2	24. April 1997 (24.04.97)	DE
(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US):	MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTEN E.V. [DE/DE]; Königstrasse 19, D-80539 München (DE).		
(72) Erfinder; und			
(75) Erfinder/Anmelder (nur für US):	HAKENBECK, Regine [DE/DE]; Knausstrasse 10, D-12157 Berlin (DE).		
(74) Anwalt:	HUBER, Bernard; Truderinger Strasse 246, D-81825 München (DE).		

(54) Title: DNA PROBES, METHOD AND KIT FOR IDENTIFYING ANTIBIOTIC-RESISTANT STRAINS OF BACTERIA

(54) Bezeichnung: DNA-SONDEN, VERFAHREN UND KIT ZUR IDENTIFIZIERUNG ANTIBIOTIKA-RESISTENTER BAKTERIENSTÄMME

(57) Abstract

The invention relates to a method for identifying antibiotic-resistant strains of bacteria, especially strains of *Streptococcus pneumoniae*. According to the invention, the method is based on a combination of hybridization experiments and sensitivity-specific and resistance-specific probes. The invention also relates to the DNA probes and to a kit for carrying out the inventive method.

(57) Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Identifizierung Antibiotika-resistenter Bakterien-Stämme, insbesondere von *Streptococcus pneumoniae*-Stämmen, wobei das Verfahren auf einer Kombination von Hybridisierungsexperimenten mit Sensitiv-spezifischen Sonden und Resistenz-spezifischen Sonden beruht. Weiter betrifft die Erfindung die DNA-Sonden und einen Kit zur Durchführung des Verfahrens.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AI	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	IU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
DJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NB	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Lichtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

DNA-Sonden, Verfahren und Kit zur Identifizierung Antibiotika-resistenter Bakterienstämme

Die vorliegende Erfindung betrifft DNA-Sonden, ein Verfahren und einen Kit zur Identifizierung Antibiotika-resistenter Bakterienstämme.

Das Auftreten Antibiotika-resistenter Bakterienstämme, insbesondere von *Streptococcus*-Stämmen, stellt ein wachsendes Problem dar. Bisher wurden Antibiotikasuszeptibilitätstests so durchgeführt, daß Bakterien isoliert wurden, eine Kultur angelegt wurde, um die minimale Antibiotika-Hemmkonzentration in einem biologischen Test zu definieren. Dieses Verfahren nimmt mindestens 1 bis 2 Tage in Anspruch. Innerhalb dieses Zeitraums kann nicht gezielt und damit nicht optimal therapiert werden. Es besteht deshalb ein Bedarf nach einer schnelleren Identifizierung bestehender Resistzenzen.

Die Aufgabe der vorliegenden Erfindung besteht darin, Mittel und Verfahren bereitzustellen, mit denen Bakterienstämme, insbesondere *Streptocokken*-Stämme, schnell und zuverlässig auf bestehende Antibiotika-Resistzenzen untersucht werden können.

Diese Aufgabe wird durch die in den Patentansprüchen angegebenen Gegenstände gelöst.

Die Erfindung wird nachfolgend anhand der Penicillin-Resistenz von *Streptococcus pneumoniae* beschrieben. Dieses Prinzip gilt jedoch auch entsprechend allgemein für Bakterien und für Resistzenzen gegen andere Antibiotika. Beispielshaft seien Neisserien und MRSA-Stämme (*Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*), die keine β -Lactamase produzieren, genannt.

- 2 -

Alle Penicillin-resistenten *S. pneumoniae*-Stämme b sitzen veränderte Penicillin-Targetproteine (Penicillin-bindende Protein , PBP). Die DNA-Sequenzen von Genen, die bei der Entwicklung von Penicillin-Resistenz in *Streptococcus pneumoniae* eine ausschlaggebende Rolle spielen, sind inzwischen in einer Anzahl von penicillinresistenten Streptokokken-Stämmen bestimmt worden. Es wurden drei Gene identifiziert, in denen bei der Entwicklung einer Penicillin-Resistenz zwischen sensitiven und resistenten Stämme Unterschiede auftreten: PBP2x, PBP1a und PBP2b.

Ein Vergleich der DNA-Sequenzen zeigt innerhalb der Gene Bereiche auf, die in allen sensitiven *S. pneumoniae* Stämmen vorhanden sind, aber in resistenten Stämmen verändert sind. In diesem Zusammenhang wird auf Fig. 1 verwiesen, wo gezeigt ist, daß sich die resistenten Stämme vom sensitiven Stamm R6 im PBP2x Gen mehr oder weniger deutlich unterscheiden, aber auch untereinander Unterschiede aufweisen.

Aufgrund der obigen Erkenntnis, daß es innerhalb bestimmter Gene Unterschiede zwischen Penicillin-sensitiven und -resistenten Stämmen gibt, wurden von der Anmelderin DNA-Sonden entwickelt, mit denen resistente und sensitive Stämme differenziert werden können. In diesem Zusammenhang wird auf Fig. 4 verwiesen. Die Sonden, die spezifisch für sensitive Sequenzen sind, diskriminieren Gene, die für niedrigaffine PBP-Varianten codieren, welche für Penicillin-Resistenz verantwortlich sind. Die Sonden, die spezifisch für resistente Sequenzen sind, reagieren mit einer sehr häufig vorkommenden Klasse von PBP-Varianten und können auch für epidemiologische Zwecke verwendet werden.

Von der Anmelderin wurden folgende DNA-Sonden identifiziert:

- a) Sensitiv-spezifische Sonden für PBP2x. Die Zahlen unter der Rubrik "Nukleotid" beziehen sich auf die Nukleotide der publizierten Sequenz (Laible et al., Mol. Microbiol. 5, S. 1993-2002 (1991)). Die Zahlen in Klammern beziehen sich auf das Codon und die Position (1,2 oder 3) im Codon des

- 3 -

Strukturgens. Die Anzahl der Basen im Nukleotid ist mit "mer" angegeben.

Nukleotid (Codon)	Oligonukleotid	-mer
314-330 (105.2-110.3)	<u>AGT CAG CAA CGG GTA AG</u> (1)	17
758-774 (253.2-258.3)	<u>AAC GAA CGA TCG ACG GT</u> (2)	17
792-809 (264.3-270.2)	<u>CAT TTC CAG NCC CCT CCA</u> (3)	18 (N: bevorzugt C)
1098-1114 (366.3-372.1)	<u>TGC AGA TGC CAC GAT TC</u> (4)	17
1302-1317 (434.2-439.3)	<u>CTG GTC AGC TTC CTG CG</u> (5)	17
1677-1696 (559.3-566.1)	<u>TGG TTA TCT AGT CGG GTT AA</u> (6)	20
1715-1731 (572.2-577.3)	<u>CTG TAT CGA TGA GTC CG</u> (7)	17
2011-2029 (671.1-677.1)	<u>AAC AGT TCT GCT GAA GAA G</u> (8)	19

- b) Resistenz-spezifische Sonden für PBP2x (wie oben; Sequenzen in Klammern entsprechen den korrespondierenden Abschnitten bei sensitiven Stämmen)

1065-1084 (355.3-361.3)	(AGG AGA AGT CTT TAA TAG T) <u>TGG AGA ATA NTT CAA TAG N</u> (I)	19 (N: bevorzugt C)
1202-1221 (401.2-407.3)	(CCC TCC TTG AGC AAA AGA TG) <u>GTC TAC TTG AAC AAA AAA TG</u> (II)	20
1549-1566 (517.1-522.3)	(TTG GTA CGG ACG GAT CCG) <u>TTA GTT GGG ACG GAC CCT</u> (III)	18
1759-1776 (587.1-592.3)	(GTG ACG GTC CAA CAA CCT) <u>GTA ACN NTT CAA CAG CCT</u> (IV)	18 (N: bevorzugt G)

- 4 -

- c) Sensitiv-spezifische Sonden für PBP1a (Zahlen beziehen sich auf die Nukleotide der publizierten Sequenz des Strukturgens; Martin et al., EMBO J. 11, S. 3831-3836 (1992))

(1034-1051)	TAG GAG CAC GCC ATC AGT (in den meisten bekannten Sequenzen spezifisch)	18
1631-1648	GAC GAA ATG CCT ATC TTG	18
1722-1740	CTC TCA ATT TGT AGC ACC T	19
1794-1812	CTA TTC TAA CCG TCT GAC A	19

- d) Resistenz-spezifische Sonden für PBP1a

945-961	(TAC AGA CGA ATA CGT CGC C) CTC CGA NCA ATA CGT CTC T	19 (N:bevorzugt T)
1735-1754	(GCA CCT GAT GAA CTA TTT GC) GCT CCA GAT NAA ATG TTT GT	20 (N:bevorzugt G)

- e) Sensitiv-spezifische Sonden für PBP2b (Zahlen beziehen sich auf die Nukleotide der publizierten Sequenz des Strukturgens; Hakenbeck, R., Matrin, C., Dowsen, C., Grebe, T., J. Bacteriol. 176, S. 5574-5577 (1996))

1329-1348 ATC AAA TAC CTA TAT GGT CC 20

N = beliebiges Nukleotid

Die obigen bzw. durch ein oder mehrere Nukleotide, bevorzugt bis 4 Nukleotide, davon abweichende Sonden eignen sich bestens, um unbekannte Streptococcus pneumoniae Stämme auf Resistenzen gegen Penicillin zu untersuchen.

Dafür werden erfindungsgemäß Bakterien aus einer Probe abzentrifugiert und im Falle von S. pneumoniae die PBP-Gene (die Resistenzdeterminanten) direkt über

PCR (polymerase chain reaction) wie in der Literatur beschrieben (Grebe und Hakenbeck (1996), Antimicrob. Agents Chemother. 40, S. 829-834) amplifiziert. Der Vorteil bei *S. pneumoniae* besteht darin, daß eine Detergenz-induzierte Lyse schnell erfolgt und damit eine PCR ohne langwierige DNA-Präparationen erfolgen kann. Da dieser Schritt bei anderen Streptokokken nicht gelingt, wird mit diesem Schritt spezifisch nur Pneumokokken-DNA amplifiziert. Alternativ wird bakterielle DNA (chromosomal und/oder extrachromosomal) gemäß Standardmethoden isoliert. Diese DNA wird mit mindestens einer Sensitiv-spezifischen Sonde und mit mindestens einer Resistenz-spezifischen Sonde unter Standardbedingungen, die dem Fachmann hinreichend bekannt sind, hybridisiert (s. z.B. Maniatis et al., Molecular Cloning, Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory). Bevorzugt erfolgt die Hybridisierung unter stringenten Bedingungen, wie z.B. 20°C unter dem Schmelzpunkt der hybridisierenden DNA. Die Oligonukleotide werden vorzugsweise so gewählt, daß sie ähnliche Schmelztemperaturen haben und somit mehrere in demselben Hybridisierungsansatz mit denselben Bedingungen getestet werden können (s. Fig. 2). Die Oligonukleotide werden bevorzugt markiert angeboten (P^{32} , S^{35} , Biotin/Avidin-System; Digoxigenin (DIG)-markiert; Fluorescein-markiert) und gegen immobilisierte DNA hybridisiert. Alternativ werden die Oligonukleotide nicht markiert auf einem Oligonukleotid-Mikroarray angeboten, und die zu hybridisierende DNA über PCR gewonnen und bei der Amplifizierung markiert.

Aus dem Hybridisierungsergebnis kann man dann schließen, ob der unbekannte Stamm-Antibiotika-sensitiv ist oder nicht. Bei der Hybridisierung sollte, je nach Resistenzgen, mindestens eine sensitiv-spezifische Sonde und eine resistenzspezifische Sonde verwendet werden. Vorteilhafterweise wird die DNA des unbekannten Stamms jedoch mit mehreren sensitiv-spezifischen und Resistenzspezifischen Sonden nacheinander hybridisiert, da eine Resistenz-Abschätzung mittels nur einer Kombination von sensitiv-spezifischen Sonden und Resistenzspezifischen Sonden mit Fehlern behaftet sein kann und eher nur als grobe Abschätzung diesen kann. Dies gilt insbesondere für den Fall der Penicillinresistenzen bei Pneumokokken und Neisserien

Bevorzugte Hybridisierungsbedingungen richten sich nach dem AT-Gehalt und Länge der Oligonukleotide. Die Wahl der geeigneten Bedingungen kann der Fachmann mit seinem Fachwissen ausführen. So werden beispielsweise 10-100 ng/ml markiertes Oligonukleotid für PBP2x (s. oben) bei einer Hybridisierungs-temperatur von 45°-60°C mindestens 5 Stunden, bevorzugt über Nacht, in SSC-Hybridisierungslösung eingesetzt.

Die Oligonukleotide können auch als PCR-Primer verwendet werden, um damit einen PCR-Test aufzubauen (s. Fig. 3). Bei diesem Test kann auf die etwas zeitaufwendigere Hybridisierung verzichtet werden, allerdings müssen pro Stamm mehrere PCRs angewendet werden. Diese Methode ist vor allem für epidemiologische Zwecke geeignet.

Die Tatsache, daß weniger Sonden für PBP1a und besonders für PBP2b bekannt sind, ergibt sich aus der Tatsache, daß in PBP1a und besonders in PBP2b kleinere Genbereiche für die Resistenz von Bedeutung sind und daher auch nur kleinere Bereiche eine Sequenzvariation aufweisen.

Die Erfindung betrifft weiter einen Kit zur Durchführung des obigen Verfahrens. Dieser Kit umfaßt Mittel zur Isolierung von DNA aus Bakterien bzw. zur PCR-Amplifikation spezifischer Resistenzdeterminanten, Sensitiv-spezifische DNA-Sonden und Resistenz-spezifische DNA-Sonden (lyophilisiert bzw. als Oligonukleotid-Microarray), Reagenzien, Lösungen, Puffer sowie Mittel zur Hybridisierung und zum anschließenden Nachweis hybridisierter DNA. Die Sensitiv-spezifischen DNA-Sonden und Resistenz-spezifischen DNA-Sonden sind bevorzugt die oben aufgelisteten.

Die vorliegende Erfindung weist den Vorteil auf, daß innerhalb kürzester Zeit, d.h. innerhalb weniger Stunden, Bakterien, insbesondere Pneumokokken, hinsichtlich Antibiotika-Resistenz beurteilt werden können. Dies ermöglicht nachfolgend eine gezielte und effiziente Behandlung erkrankter Patienten.

Die Erfindung wird weiter anhand der Figuren beschrieben, welche zeigen:

Fig. 1 zeigt den Vergleich von Genabschnitten des *Streptococcus pneumoniae* PBP2x-Gen zwischen Penicillin-sensitiven und -resistenten Stämmen; Codon 85-750

R6: Penicillin-sensitiver Stamm

andere: Penicillin-resistente Stämme

Fig. 2 zeigt die Hybridisierung auf einem Oligonukleotid-Array
Die Anordnung der Sonden auf dem Array ist im ersten Block der Figur angegeben. Die Zahlen (1) bis (8) bzw. (I) bis (IV) entsprechen der Nummerierung der oben angegebenen Sonden für PBP2x.

- A) Stamm R6, eine sensitiver *S. pneumoniae* Laborstamm und stellvertretend für andere sensitive Stämme: alle Sensitivspezifischen Oligonukleotide (Nr. 1-8) werden erkannt, während alle vier Resistenz-spezifischen Oligonukleotide (I-IV) nicht erkannt werden.
- B) Stamm 2349, dessen PBP2x-Gen zu einer häufig und global vorkommenden Klasse von PBP2x-Genen resistenter Pneumokokken gehört. Nur eines der Sensitiv-spezifischen Oligonukleotide wird erkannt, da die veränderte Sequenz nicht den 3'-Bereich des Gens überdeckt. Alle anderen Sensitiv-spezifischen Oligonukleotide (Nr. 2-8) hybridisieren nicht. Alle Resistenz-spezifischen Oligonukleotide (I-IV) hybridisieren.
- C) Stamm J19, ein resisterter Stamm mit einem PBP2x, das nur teilweise Sequenzen hat, die mit dem von Stamm 2349 übereinstimmen. Eines der Resistenz-spezifischen Oligonukleotide (III) reagiert nicht.

- 8 -

- D) Stamm Pn12, ein resistenter Stamm aus Papua, dessen PBP2x eine ungewöhnliche Sequenz aufweist. Fünf der Sensitiv-spezifischen Oligonukleotide reagieren nicht, ein Beweis, daß das PBP2x keine durchgehend sensitive Sequenz aufweist (und daher Resistenz vermittelt). Allerdings reagieren auch keine der Resistenz-spezifischen Oligonukleotide, was anzeigt, daß eine ungewöhnliche Sequenz auch in dem "resistenten" Genbereich vorliegt. Stämme wie dieser stellen die Ausnahme dar, können aber auf Grund des Screens eindeutig erfaßt werden, vor allem wenn weitere Oligonukleotide verwendet werden, die für andere PBPs spezifisch sind.

Fig. 3 zeigt das Ergebnis von PCR-Reaktionen zur Amplifikation von *S. pneumoniae* R6-DNA als Auftrag auf einem Agarosegel. Als PCR-Primer wurden die oben mit (1) bis (7) gekennzeichneten PBP 2x-Sonden als "Forward-Primer" sowie jeweils Sonde (8) als "Reverse Primer" eingesetzt. Als Kontrolle wurden PCRs mit den Sonden (I) als forward-Primer und (IV) als reverse-Primer bzw. (II) als forward-Primer und (IV) als reverse-Primer durchgeführt. M = Größenmarker
Auf dem gezeigten Gel ist klar zu erkennen, daß nur die Sensitiv-spezifischen Sonden eine Amplifikation ergeben, während keine mit Resistenz-spezifischen Sonden stattfindet.

Fig. 4 (a) - (i) Ermittlung der erfindungsgemäßen Sonden durch Sequenzvergleiche

Die Erfindung wird weiter anhand eines Beispiels beschrieben.

BEISPIEL: Isolierung von S. pneumoniae Bakterien-DNA und nachfolgende Testung auf bestehende Resistenz gegenüber Penicillin

Bakterien vom Stamm S. pneumoniae R6 werden in Brain-Heart-Infusion (BHI)-Medium überimpft und über Nacht bei 37°C wachsen gelassen. Die Zellen werden abzentrifugiert und durch Resuspendieren des Sediments in 10 µl 10 mM Tris/HCl-Puffer, pH 7,2, 0,05% Triton-X100 lysiert. Je 1 µl der Zellsuspension werden pro 20 µl PCR-Ansatz (0,2 µl Taq-Polymerase, je 1 pM Oligonukleotid-primer, 2 µl 10X PCR-Puffer, 4-6 mM MgCl₂) verwendet. Für die PCR-Reaktion sind 25 Zyklen mit 5 sec. Annealing 96°C, 5 sec. Annealing 52°C, 10 sec. Extension bei 72°C ausreichend.

A) Agarose-Gelelektrophorese

In den PCR-Reaktionen (Bedingungen s. oben) werden folgende Primer-kombinationen verwendet:

<u>forward-Primer</u>	<u>reverse-Primer</u>
Sonde (1)	Sonde (8)
Sonde (2)	Sonde (8)
Sonde (3)	Sonde (8)
Sonde (4)	Sonde (8)
Sonde (5)	Sonde (8)
Sonde (6)	Sonde (8)
Sonde (7)	Sonde (8)
Sonde (I)	Sonde (IV)
Sonde (II)	Sonde (IV)

Die Bezeichnungen der Sonden entsprechen den oben bei den Sequenzen angegebenen Zahlen für PBP2x.

- 10 -

Je 4 μ l Aliquots der PCR-Reaktionen wurden auf ein 1,5%-iges Agarose-Gel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Das Ergebnis ist in Fig. 3 gezeigt. Daraus ergibt sich, daß R6 ein sensitiver Stamm ist.

B1) Dot-Blot

S. pneumoniae R6-Bakterien-DNA wird mit üblichen Primern (Grebe u. Hakenbeck (1996), Antimicrob. Agents Chemotherap. 40, S. 829-834) in einer PCR-Reaktion (Bedingungen s. oben) amplifiziert. Die PCR-amplifizierte DNA wird durch Erhitzen denaturiert (2 min. 96°C, anschließend 4°C), jeweils 2 μ l davon werden pro Probe auf eine Nylon-Membran aufgetragen. Die DNA wird durch Bestrahlung mit langwelligem UV-Licht auf der Membran fixiert, unspezifische Bindungsstellen bei 60°C in Prähybridisierungslösung (6x SSC, 5x Denhardts-Lösung, 0,1 % SDS, 50 mM Na-Phosphat-Puffer pH 6,5, 0,1 mg/ml Heringsperm-DNA) unter leichtem Schütteln für 5 Std. abgesättigt. Die Hybridisierung mit den PBP2x Sensitiv-spezifischen Oligonukleotid-Sonden (I) bis (8) bzw. den Resistenzspezifischen Sonden (I) bis (IV) erfolgt in Hybridisierungspuffer (wie Prähybridisierungslösung, jedoch mit 50 ng/ml Oligonukleotid-Sonde) über Nacht bei ca. 50°C. Das Filter wird 2 x 5 min. bei Raumtemperatur mit 2x SSC/0,1% SDS bei 55°C gewaschen. Die Proben werden mit anti-DIG-AP-Konjugat nach den Herstellerangaben (Boehringer Mannheim) angefärbt. Auch hier zeigt sich, daß nur die Sensitiv-spezifischen Sonden eine Hybridisierung ergeben, was anzeigt, daß der *S. pneumoniae*-Stamm R6 ein Penicillin-sensitiver Stamm ist.

B2) Oligonukleotid-Mikroarray

Methodisch wird wie oben unter B1) vorgegangen, jedoch mit dem Unterschied, daß die Oligonukleotide als fertiger Array angeboten werden und die zu hybridisierende DNA über PCR mittels DIG oder fluoreszeinmarkierter Nukleotide markiert werden muß. Das Prinzip der "high density" Mikroarray-Hybridisierung ist in "Nature Biotechnology 14, S. 1675-1680, 1996" beschrieben. Das Ergebnis dieses Versuchs ist in Fig. 2 A gezeigt.

Patentansprüche

- 1) Verfahren zur Identifizierung einer Antibiotikaresistenz bei Bakterien, wobei das Verfahren die folgenden Schritte aufweist:
 - (a) Isolierung von Bakterien-DNA
 - (b) Hybridisierung der in Schritt (a) gewonnenen DNA mit mindestens einer Sensitiv-spezifischen DNA-Sonde und mindestens einer Resistenz-spezifischen DNA-Sonde.
- 2) Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Bakterien *Streptococcus pneumoniae* sind.
- 3) Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, wobei es sich bei der Antibiotikaresistenz um Penicillinresistenz handelt.
- 4) Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei die Sensitiv-spezifischen Sonden ausgewählt sind aus den folgenden Oligonukleotiden bzw. sich davon durch ein oder mehrere Nukleotide unterscheiden:

AGT CAG CAA CGG GTA AG
AAC GAA CGA TGG ACG GT
CAT TTC CAG NCC CCT CCA
TGC AGA TGC CAC GAT TC
CTG GTC AGC TTC CTG CG
TGG TTA TCT AGT CGG GTT AA
CTG TAT CGA TGA GTC CG
AAC AGT TCT GCT GAA GAA G
TAG GAG CAC GCC ATC AGT
GAC GAA ATG CCT ATC TTG
CTC TCA ATT TGT AGC ACC T

- 12 -

CTA TTC TAA CCG TCT GAC A
ATC AAA TAC CTA TAT GGT CC

- 5) Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei die Resistenz-spezifischen Sonden ausgewählt sind aus den folgenden Oligonukleotiden bzw. sich davon durch ein oder mehrere Nukleotide unterscheiden:

TGG AGA ATA NTT CAA TAG N
GTC TAC TTG AAC AAA AAA TG
TTA GTT GGG ACG GAC CCT
GTA ACN NTT CAA CAG CCT
CTC CGA NCA ATA CGT CTC T
GCT CCA GAT NAA ATG TTT GT.

- 6) Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei die Sonden radioaktiv markiert sind.
- 7) Sensitiv-spezifische DNA-Sonde zur Identifizierung Penicillin-resistenter *Streptococcus pneumoniae* Stämme ausgewählt aus den folgenden Oligonukleotide bzw. sich davon durch ein oder mehrere Nukleotide unterschiedend:

AGT CAG CAA CGG GTA AG
AAC GAA CGA TGG ACG GT
CAT TTC CAG NCC CCT CCA
TGC AGA TGC CAC GAT TC
CTG GTC AGC TTC CTG CG
TGG TTA TCT AGT CGG GTT AA
CTG TAT CGA TGA GTC CG
AAC AGT TCT GCT GAA GAA G
TAG GAG CAC GCC ATC AGT
GAC GAA ATG CCT ATC TTG

- 13 -

CTC TCA ATT TGT AGC ACC T
CTA TTC TAA CCG TCT GAC A
ATC AAA TAC CTA TAT GGT CC

- 8) Resistenz-spezifische DNA-Sonde zur Identifizierung Penicillin-resistenter *Streptococcus pneumoniae* Stämme ausgewählt aus den folgenden Oligonukleotide bzw. sich davon durch ein oder mehrere Nukleotide unterscheidend:

TGG AGA ATA NTT CAA TAG N
GTC TAC TTG AAC AAA AAA TG
TTA GTT GGG ACG GAC CCT
GTA ACN NTT CAA CAG CCT
CTC CGA NCA ATA CGT CTC T
GCT CCA GAT NAA ATG TTT GT

- 9) Kit zur Identifizierung Antibiotika-resistenter Bakterienstämme aufweisend Mittel zur Isolierung von DNA aus Bakterien bzw. zur PCR-Amplifikation spezifischer Resistenzdeterminanten, Sensitiv-spezifische DNA-Sonden und Resistenz-spezifische DNA-Sonden, Reagenzien, Lösungen, Puffer sowie Mittel zur Hybridisierung und zum anschließenden Nachweis hybridisierter DNA.

Streptococcus pneumoniae PBP 2x

Mosaic Genes in Penicillin Resistant Strains

(codon 85 - 750)

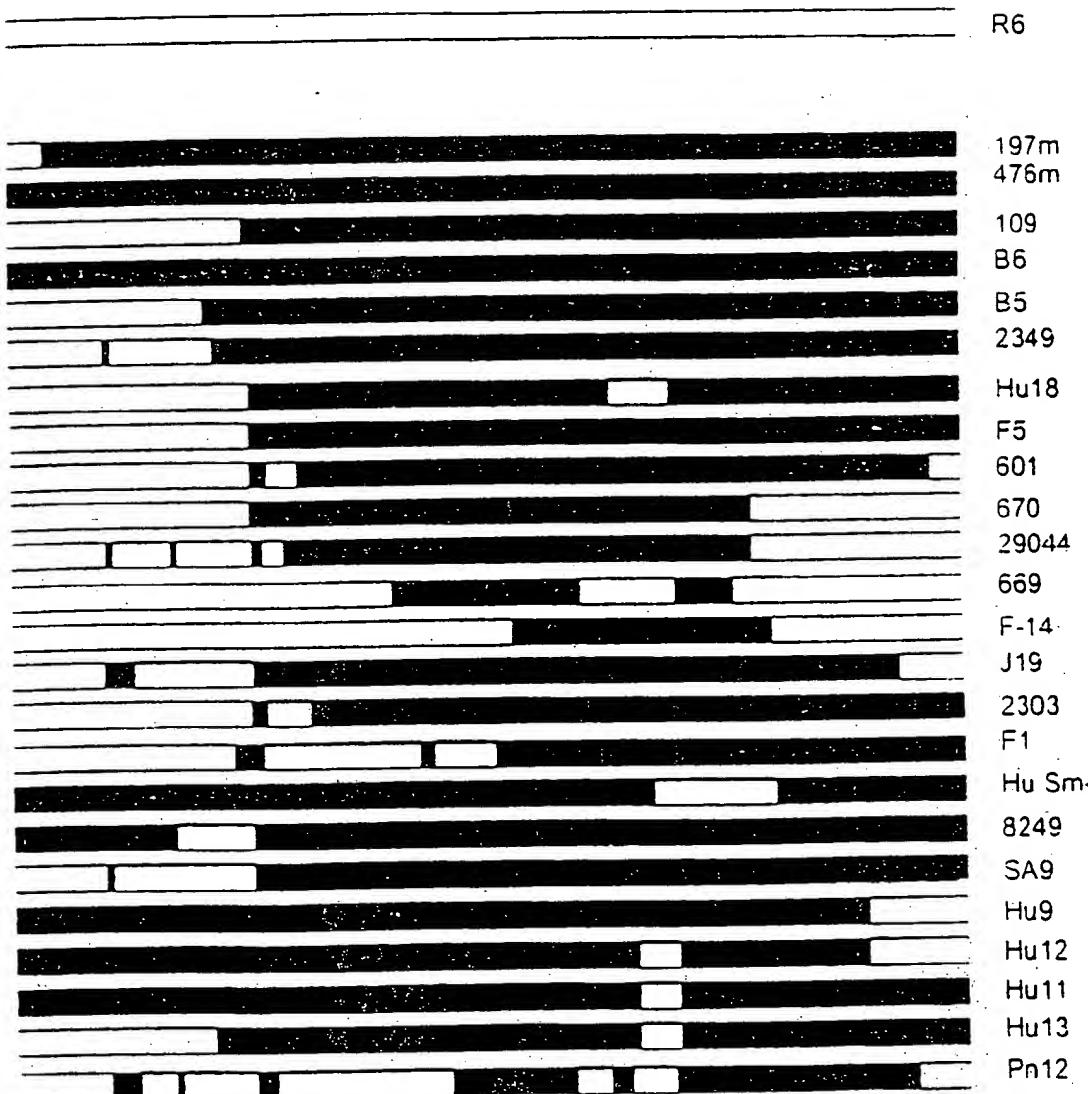


Fig. 1

Rasterbeispiel für ein Oligonukleotid-Array

1	2	3	4
5	6	7	8
I	II	III	IV

A (R6 = sensitiv)

+	+	+	-
+	+	+	-
-	-	-	-

B (2349 - resistent, global vorkommender Klon)

-	-	-	-
-	-	-	-
-	+	+	-

C (J19 - resistent)

-	-	-	-
-	-	-	-
-	+	+	+

D (Pn 12 - resistent, aus Papua und ungewöhnlich)

+	-	-	-
-	-	-	-
-	-	-	-

PCR

3/12

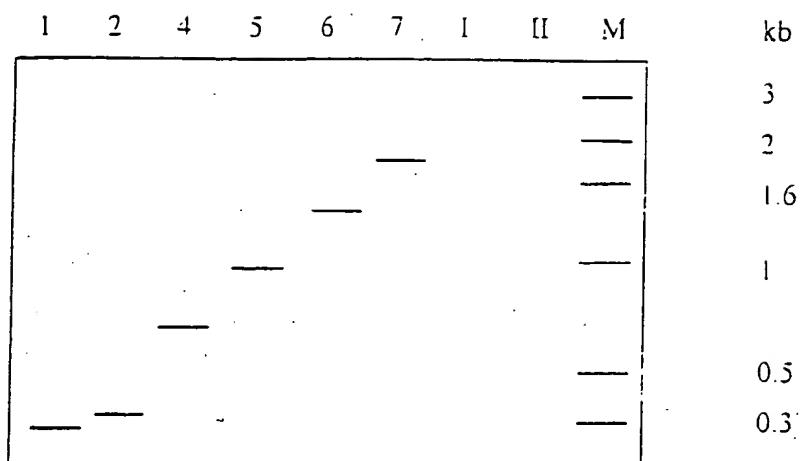


Fig. 3

4/12

Fig. 4

5/12

Fig. 4 (Forts. I)

6/12

Fig. 4 (Forts. II)

7/12

Fig. 4 (Forts. III)

8/12

Fig. 4 (Forts. IV)

9/12

Fig. 4 (Forts. v)

10/12

Fig. 4 (Forts. VI)

12/12

Fig. 4 (Forts. VIII)